B1401 MB

体外診断用医薬品

**2014年3月改訂(第4版、＿＿：訂正箇所)
*2009年1月改訂(第3版)

この添付文書をよく読んでから使用して下さい。

日本標準商品分類番号
877439
承認番号
20900AMY00081000

デオキシピリジノリンキット

オステオリンクス®「DPD」

■全般的な注意

⑴本製品は体外診断用医薬品です。それ以外の目的には使用しないでください。
⑵診断は、他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断してください。
⑶操作の前に本添付文書をよく読み、操作方法を十分理解してから検査を始めてください。添付文書以外の方法で検査された場合の結果については保証できませんので注意してください。
⑷本製品の測定用緩衝液、濃縮洗浄液及び基質用緩衝液には、保存剤としてアジ化ナトリウムが含まれています。万一、誤って目や口に入ったり、皮膚に付着した場合は、水で十分に洗い流す等の応急措置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けてください。
⑸使用する機器の添付文書及び取扱説明書をよく読んでから使用してください。

■形状、構造等(キットの構成)

本キットには、以下の9種類の構成試薬が含まれており96テスト用です。

⑴抗体結合マイクロプレート マウス抗デオキシピリジノリン(Dpd)モノクローナル抗体 (標準Dpd液0nmol/Lにおける吸光度が1.0～2.0を示す量)	1プレート(8ウエル×12ピース) (マイクロウエルプレート)
⑵標準Dpd液 (0,3,10,30,100,300nmol/L)	各1バイアル (液剤：0.3mL)
⑶Dpdコントロール(高濃度、低濃度)	各1バイアル (液剤：0.3mL)
⑷酵素標識Dpd アルカリフォスファターゼ標識Dpd (9.6ng/1回測定分中)	3バイアル (凍結乾燥品)
⑸測定用緩衝液	1バイアル (液剤：55mL)
⑹基質錠剤 p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム (0.3mg/1回測定分中)	3錠(基質各20mg含有) (錠剤)
⑺基質用緩衝液	3バイアル (液剤：各10mL)
⑻濃縮洗浄液	1バイアル (液剤：55mL)
⑼停止液	1バイアル (液剤：15mL)

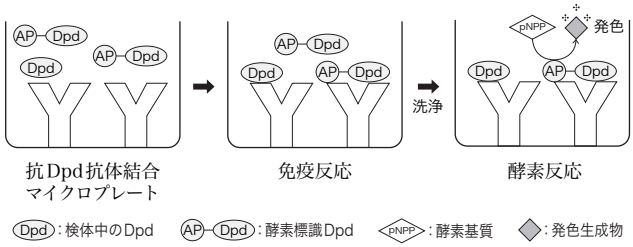
■使用目的

尿中デオキシピリジノリン(Dpd)の測定

■測定原理

本キットは競合法EIAの原理に基づき検体中のデオキシピリジノリン(Dpd)の濃度を求めるものです。抗Dpd抗体が結合したマイクロプレートウエルにDpdを含む検体と酵素(アルカリフォスファターゼ；AP)標識Dpdを同時添加し、抗体に対して一定時間競合的に反応させた後、洗浄を行って未反応の試薬(酵素標識Dpd)を取り除きます。続いてウエルに酵素基質(p-ニトロフェニルリン酸；pNPP)を添加して、ウエル上に捕捉された酵素標識Dpdの量をその酵素活性により基質が分解されて生成された物質の吸光度によって測定します。検体中のDpd濃度は、同時操作した標準Dpd液の吸光度に基づき作成された標準曲線から算定されます。
本キットの抗Dpd抗体は、ピリジノリン等類縁物質への交差反応が少ないマウスモノクローナル抗体を使用しているため、特異的にデオキシピリジノリンを測定することが可能です。

〔測定原理図〕



■操作上の注意

1. 測定試料の採取・保存について

⑴尿は、午前中の第二尿を用います。
⑵5回以上凍結融解を繰り返した尿は使用しないでください。
⑶尿を保存するときに防腐剤は添加しないでください。
⑷尿は、2～8℃(1週間以内)又は-20℃以下で保存してください。
⑸冷凍保存された検体を使用する場合は、融解後十分に攪拌し、成分を均質にしてから使用してください。

2. 測定試料取扱い上の注意点

測定試料の採取、取扱い、保管ならびに廃棄においては、バイオハザード防止上の十分な注意を払ってください。

3. 妨害物質・妨害薬剤

本キットは、尿中の下記物質の下記濃度において測定値に影響を受けませんでした。

溶血ヘモグロビン	0～500mg/dL
アルブミン	0～500mg/dL
グルコース	0～5g/dL
ビリルビン(遊離型)	0～2mg/dL
アスコルビン酸	0～25mg/dL

4. 操作上の注意点

⑴標準曲線は、測定毎に作成してください。
⑵300nmol/Lを超えた検体は、測定用緩衝液でさらに10倍希釈して再測定してください。その場合、測定値の希釈補正を忘れないでください。
⑶標準Dpd液0nmol/Lの吸光度が0.8より低くなったときは、その回の測定の結果は信頼できないので測定をやり直してください。
⑷キットに含まれるDpdコントロールについては、キットに添付されている“Certificate of Analysis(分析証明書)”の表示値を参考にして各施設毎に測定許容範囲を設定し、毎回の測定値をその測定許容範囲と比較することによって、その回のアッセイ操作の正当性の確認のために使用してください。もし、測定値が各施設で設定された測定許容範囲に適合しなかったときは、その回のアッセイの測定結果の信頼性は低いと考えられますので再測定を行ってください。
⑸洗浄工程に関して、操作方法の記載をよく読んで行ってください。
⑹Dpd標準液、コントロール及び酵素標識Dpd液は光に敏感なので、これら試薬を強い光(特に直射日光)に当てないでください。
⑺酵素反応は基質溶液と停止液の添加順序、時間間隔を正確に一定にしてください。
⑻試薬の添加には、時間管理をより正確にするために、できるだけマルチチャンネルピペット又は連続分注ピペッターを使用してください。
⑼測定結果の再現性のよい解析を行うためには、標準曲線の作成及び測定値の算出に4-パラメーター曲線近似解析用ソフトウェアを使用することが望まれます。

■用法・用量(操作法)

1. 試薬の調製法

使用するストリップ数に合わせて、下記の表を参考にして必要量の各試薬の調製を行います。
基質用緩衝液は、あらかじめ20～28℃にもどして使用してください。

表1. 試 薬 の 必 要 量 (参考)

ストリップ(8×1)数	4	6	8	12
測定可能検体数※	8	16	24	40
酵素標識Dpdバイアル数	1	1	2※※	2※※
基質溶液バイアル数	1	1	2※※	2※※
希釈洗浄溶液(mL)	100	150	200	300

※ 二重測定した場合
※※ 2バイアル使用するときは、使用前に中身を合わせて混合してください。

⑴濃縮洗浄液を脱イオン水又は蒸留水で10倍に希釈し、必要量の希釈洗浄溶液を準備します。(希釈洗浄溶液は、20～28℃で保存して24時間以内に使用します。ただし、4. 測定方法の⑹に記載の**特殊洗浄法**を行うときは使用まで2～8℃で保存してください。)
⑵酵素標識Dpdの必要数バイアルの各々に7mLの測定用緩衝液を添加し十分に溶解、混和し、酵素標識Dpd溶液を調製します。
(使用2時間以内に調製し、使用まで2～8℃で保存します。)
⑶基質用緩衝液の必要数バイアルの各々に基質錠剤1錠を添加し十分に溶解、混和し、基質溶液を準備します。
(使用60分以内に調製し、使用まで20～28℃で保存します。)

2. 必要な器具・器材等

⑴蒸留水又は脱イオン水
⑵濃縮洗浄液希釈用コンテナー
⑶検体、標準液及びコントロール希釈用チューブ
⑷ピペット(7mL)及びマイクロピペット(50～500μL)
⑸連続分注器あるいはマルチピペット(100～300μL)
⑹マイクロプレートリーダー(405nmフィルター内蔵)

3. 尿検体、標準Dpd液及びDpdコントロールの希釈

尿検体、標準Dpd液及びDpdコントロールをそれぞれ測定用緩衝液で10倍に希釈します。
(例：50μL検体(標準液、コントロール)+450μL測定用緩衝液)

4. 測定方法

測定は原則として、二重測定で行います。
⑴必要数の抗体結合プレートのストリップとマイクロプレート枠を袋から取出します。未使用のストリップが入った袋は完全に再密閉しておきます。各ストリップには、アッセイ中に枠から離れて混乱しないようにラベリングを行います。
⑵所定のウエルに50μLの希釈検体、希釈標準Dpd溶液あるいは希釈Dpdコントロール溶液を添加します。
⑶全ウエルに100μLの酵素標識Dpd溶液を添加します。
⑷プレートカバーでプレートをシールし、4℃、暗所で2時間静置反応させます。
⑸使用する30～60分前に、基質用緩衝液の必要バイアル数(表1.参照)に基質錠剤を添加し、そのまま使用まで20～28℃で放置し、使用直前にバイアルを強く振って完全に溶解、混合します。
(2バイアル使用するときは、使用前に中身を合わせて混合してください。)
⑹以下の要領でウエルを洗浄します。
1)プレートを手でひっくり返して振り、ウエル内の反応液を捨てます。
2)プレートの各ウエルに20～28℃で保存した希釈洗浄溶液300μLを入れます。
3)1)と同様の操作で希釈洗浄溶液を除去します。
4)さらに 2)～3) の操作を2回繰り返します。(計3回)
5)最後の洗浄溶液除去後、さらにプレートを逆さにしたまま机の上に敷いたペーパータオルにプレートを強く叩きつけてウエル内の溶液を完全に除きます。

以上の操作は、2分以内に完結させてください。完結できないときは、下記の特殊洗浄法を用いてプレート洗浄を行います。

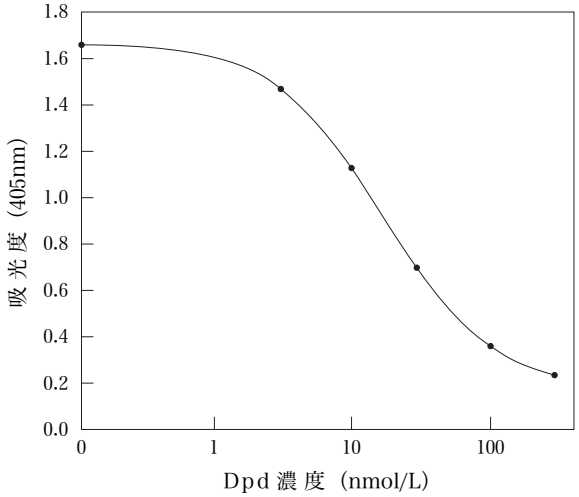
特殊洗浄法
①上記洗浄法 1)～5) の操作を2～8℃で保存した希釈洗浄溶液を用いて行います。
②プレートをペーパータオル上に逆さにしたまま5分間放置し、プレートを20～28℃にもどします。

⑺各ウエルに⑸で調製した基質溶液を150μLずつ入れます。
⑻20～28℃で1時間静置反応させます。
⑼反応後、各ウエルに基質溶液を加えた順に停止液を100μLずつ加えます。
⑽ウエル内に気泡がないこと、ウエルの底が汚れていないことを確認の上、プレートリーダーで405nmの吸光度を測定します。
(停止液添加後、15分以内に測定してください。また、2波長のプレートリーダーを使用するときは、対照側の波長を600～650nmに設定します。)
⑾標準Dpd液の吸光度から標準曲線を作成し、それをもとに各検体及びコントロールのDpd濃度を算出します。

操 作 手 順 概 略

検体、標準Dpd液、Dpdコントロールを測定用緩衝液で10倍希釈する
↓
抗体結合ウエルに上記希釈検体、標準液、コントロールを50μL入れる
↓
各ウエルに酵素標識Dpd溶液を100μL入れる
↓
4℃、暗所で2時間静置する
↓
洗浄する(300μL×3回)
↓
各ウエルに基質溶液を150μL入れる
↓
20～28℃で60分間静置する
↓
各ウエルに停止液を100μL入れる
↓ 15分以内に
吸光度を測定する(波長：405nm)
↓
標準曲線を作成し、検体、コントロールの濃度を算出する

標 準 曲 線 の 例



■測定結果の判定法

⑴測定値の希釈補正は必要ありません。(検体を所定の倍率以上希釈しなかった場合。)

⑵本キットの測定値はいったんnmol/Lで求められますが、最終Dpd測定値としては、同一検体について別途求めたクレアチニン(Cr)濃度(mmol/L･Cr)で割った値(nmol/mmol･Cr)として表示します(クレアチニン濃度：mg/dL×0.088＝mmol/L･Cr)。

⑶健常男性263例(年齢25～72歳)，正常骨量女性353例(20～70歳)で検討した参考基準値は以下の通りでした。

男性 2.1～5.4nmol/mmol･Cr

女性 2.8～7.6nmol/mmol･Cr

注)基準値は母集団の年齢等で異なる可能性がありますので、各施設で個々に合わせた基準値を設定することが望まれます。

⑷閉経後女性については、骨粗鬆症による高値を示す場合がありますので注意してください。

■臨床的意義

デオキシピリジノリン(Dpd)は、骨基質の有機成分の約90％を占めるⅠ型コラーゲンの分子間において架橋を形成し、コラーゲン繊維の安定性に寄与している架橋物質です。このDpdは、骨基質内で成熟したコラーゲンのリジン残基に対する特異的な酵素の作用により形成され、単独あるいは成熟前のコラーゲンでは生成されません[1)]。そして、骨破壊時のコラーゲンの分解に伴い骨外へ放出されますが、体内では代謝を受けず尿中に排泄されます[2)]。また、食事に含まれていても消化管からは吸収されません[3)]。従って、尿中のDpd量の測定は骨吸収の状態を評価するためのよい指標となると考えられており、文献報告においては骨ページェット病、原発性副甲状腺機能亢進症、甲状腺機能亢進症、骨粗鬆症、ビタミンD欠乏性骨軟化症あるいは癌の骨転移など骨代謝の異常が伴う疾患群において尿中Dpd値が正常群に比べ有意に上昇すること[4),5),6)]、これら疾患の治療時に治療効果を反映して変動すること[7)]が報告されています。

オステオリンクス「DPD」は、マイクロプレートを用いたEIA法により尿中のデオキシピリジノリン(Dpd)濃度を定量する体外診断用医薬品で、ピリジノリン等類縁物質の影響をほとんど受けずに特異的にDpdを定量することが可能です[8)]。

本邦における当社臨床試験により、本キットによる尿中Dpd測定について、以下の臨床上の意義が認められました。

・癌の骨転移診断(骨転移の有無の診断、肺癌における骨転移早期診断、治療経過観察)
・原発性副甲状腺機能亢進症における骨減少症の病態把握
・甲状腺機能亢進症、骨ページェット病の診断
・骨粗鬆症の薬剤治療方針の選択及び薬剤効果判定

■臨床試験データ

1. 代謝性骨疾患(甲状腺機能亢進症，骨ページェット病，原発性副甲状腺機能亢進症，骨粗鬆症)の指標および癌の骨転移の指標として、臨床的意義が認められました(図1，図2，図3)。

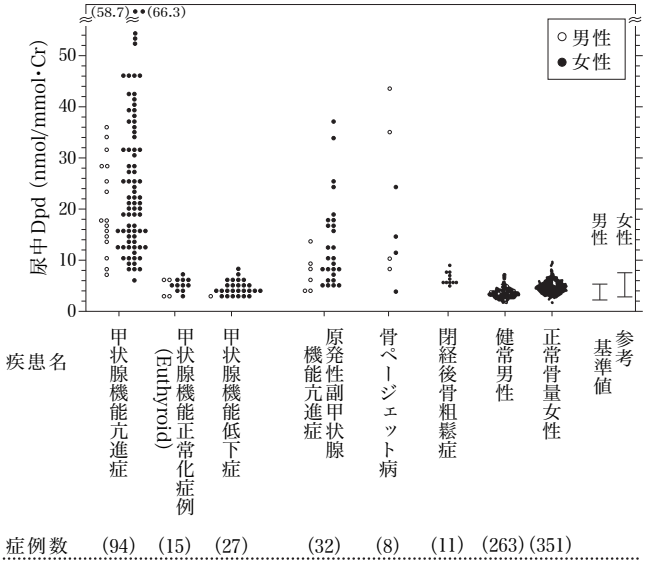


図1．各種代謝性骨疾患における尿中Dpd値の分布

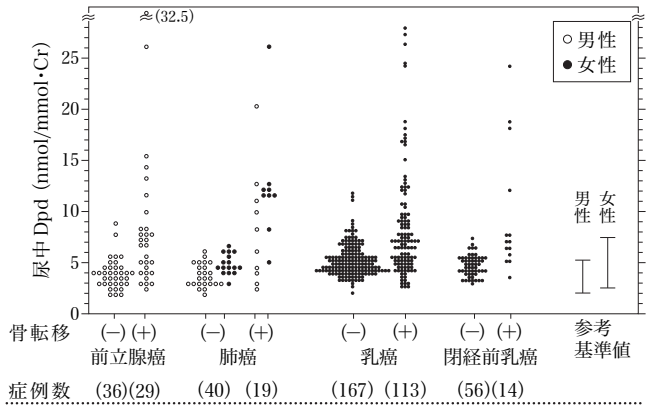


図2．各種癌の骨転移における尿中Dpd値の分布

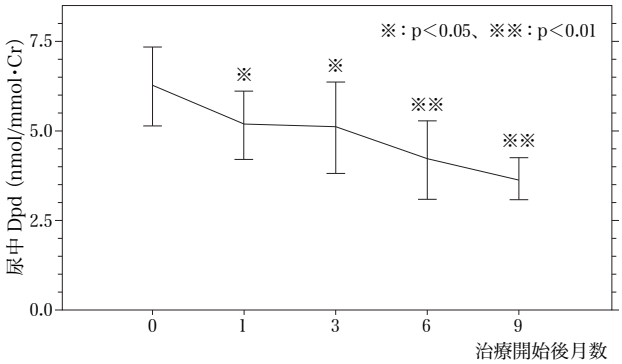


図3．閉経後骨粗鬆症に対するホルモン補充療法における尿中Dpd値の推移[9)]

2. 本キットを用いた癌の骨転移の治療経過観察では、12症例中10例でいずれの時点においても骨シンチグラフィの変化に対応しており、骨転移病巣の治療時の状態把握に臨床的意義が認められました[10)]。

3. 原発性副甲状腺機能亢進症による骨減少症において、当キットによる尿中Dpd測定値は腰椎骨密度と高い相関(r＝−0.74, p＜0.01 , n＝13)を認め、尿中Dpd測定による同疾患の骨減少症の病態把握に臨床的意義が認められました[11)]。

■性能

1. 性能

⑴感度

標準Dpd液0nmol/Lを測定するとき、その吸光度は1.0以上である。

標準Dpd液300nmol/Lを測定するとき、その吸光度は0.3以下である。

標準Dpd液0nmol/Lと3nmol/Lを測定するとき、3nmol/Lの吸光度は0nmol/Lの吸光度より低値である。

⑵正確性

既知濃度の管理検体を測定するとき、得られた値は表示値の±20％以内である。

⑶同時再現性

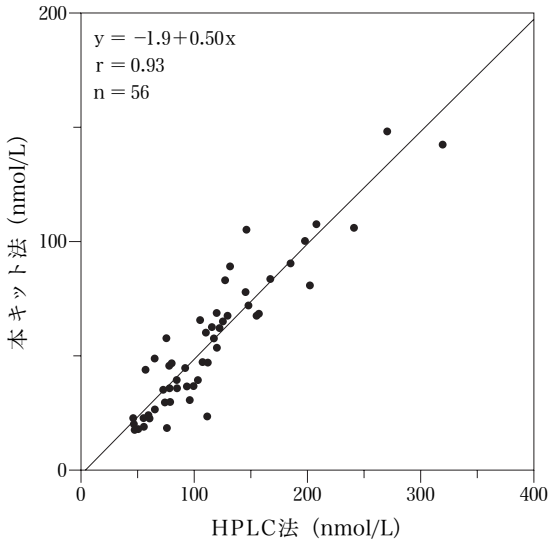
同一検体を6回同時に測定するとき、その変動係数は15％以下である。

⑷測定範囲

本キットの測定範囲は、3～300nmol/Lである。

2. 相関性試験成績

HPLC法[12]との相関は、下記の通り良好でした。



3. 較正用基準物質（標準物質）

自社基準品

■使用上又は取扱い上の注意

1. 取扱い上（危険防止）の注意

⑴測定試料（検体）は、各種ウイルス性あるいは細菌性の感染の恐れのあるものとして取り扱ってください。検査にあたっては、感染の危険を避けるため使い捨て手袋を着用し、また口によるピペッティングは行わないでください。

⑵本キットの測定用緩衝液、濃縮洗浄液及び基質用緩衝液には0.05％のアジ化ナトリウムが、停止液には0.5mol/L水酸化ナトリウムがそれぞれ含まれていますので、取扱いには十分注意してください。万一、誤って目や口に入ったり、皮膚に付着したりした場合は、水で十分に洗い流す等の応急措置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けてください。

2. 使用上の注意

⑴本キットの保存は凍結を避け、貯蔵方法に従い保存してください。凍結した試薬は品質が変化して正しい結果が得られないことがありますので使用しないでください。

⑵外箱に記載された使用期限を過ぎたキットは使用しないでください。

⑶キット内の試薬は正確な反応が得られるように組み合わされていますので、異なるロット番号の試薬を組み合わせて使用しないでください。

3. 廃棄上の注意

⑴使用後の検体、試薬及び容器等は次亜塩素酸ナトリウム（有効塩素濃度1,000 ppm、1時間以上浸漬）又はグルタールアルデヒド（2％、1時間以上浸漬）による消毒処理あるいはオートクレーブ（121℃、20分以上）による滅菌処理を行った上で、各施設での医療廃棄物に関する規定並びに水質汚濁防止法等の規制に従い適切な方法で廃棄してください。

⑵アジ化ナトリウムは、酸と混合すると有毒ガスを生じる可能性がありますので、廃棄時には酸と混合しないでください。また、排水配管金属中に蓄積した場合、爆発性の化合物を生じる恐れがありますので、廃棄時は大量の水道水で洗い流してください。

■貯蔵方法・有効期間

⑴貯蔵方法：2～8℃に保存する。

⑵有効期間：製造後15ヵ月（使用期限は、外箱に表示）

■包装単位

1キット 96回測定用

（測定検体数：40検体〔二重測定の場合〕）

■主要文献

1) 畑隆一郎：コラーゲンの基礎
THE BONE, 3(3)：33–40, 1989.

2) 高橋正哲：尿中ピリジノリン、デオキシピリジノリン
骨代謝マーカー（福永仁夫他編集、メディカルレビュー社），94–102, 1995.

3) Colwell A. et al.：Effect of diet on deoxypyridinoline excretion.
In：Christiansen C., Overgaard K.(eds),
Osteoporosis 1990, Osteopress, Copenhagen：590–591, 1990.

4) Uebelhart D. et al.：Urinary excretion of pyridinium crosslinks：
A new marker of bone resorption in metabolic bone disease.
Bone Mineral, 8：87–96, 1990.

5) Robins SP. et al.：Evaluation of urinary hydroxypyridinium crosslinks measurement as resorption markers in metabolic bone disease.
Eur. J. Clin. Invest., 21：310–315, 1991.

6) Ohishi T. et al.：Urinary bone resorption markers in patients with metabolic bone disorders.
Bone, 15：15–20, 1994.

7) Uebelhart D. et al.：Effect of menopause and hormone replacement therapy on urinary excretion of pyridinium crosslinks.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 72：367–373, 1991.

8) Robins SP. et al.：Direct enzyme–linked immunoassay for urinary deoxypyridinoline as a specific marker for measuring bone resorption.
J. Bone Miner. Res., 9：1643–1649, 1994.

9) 中村哲郎, 他：閉経後骨粗鬆症に対するホルモン補充療法における腰椎骨密度および骨代謝マーカーの変化.
ホルモンと臨床, 44(9)：125–128, 1996.

10) 小泉　満, 他：転移性骨腫瘍臨床評価における骨吸収マーカー尿中デオキシピリジノリンの有用性の検討.
ホルモンと臨床, 44(9)：1011–1023, 1996.

11) 折茂　肇, 他：EIA法による尿中デオキシピリジノリンの代謝性骨疾患における有用性の検討.
ホルモンと臨床, 44(8)：873–883, 1996.

12) Black D. et al.：Quantitative analysis of Pyridinium Crosslinks of collagen in urine using ion–paired reversed–phase high–performance liquid chromatography.
Anal. Biochem,. 169：197–203, 1988.

***■問い合わせ先

DSファーマバイオメディカル株式会社
学術開発第1グループ
大阪府吹田市江の木町33番94号（〒564–0053）
電話 06–6337–5941, FAX 06–6337–6020

***製造販売元

DSファーマバイオメディカル株式会社
大阪府吹田市江坂町2丁目1番43号（〒564-0063）
海外製造元　米国 カイデル コーポレーション

B1401 MB